Istituto di Clinica Medica della R. Università di Napoli
diretto dal Prof. CARDARELLI

RICERCHE CLINICHE E SPERIMENTALI

SULLA

TOSSINA ED ANTITOSSINA DIFTERICA

PER I DOTTORI

G. Zagari
Coadiutore, prof. pareggiato
di Patol. e Clin. Prop.

A. Calabrese
Preparatore

Estratto dal *Giornale Intern. delle Scienze Mediche* – Anno XVII.

NAPOLI
LIBRERIA DETKEN & ROCHOLL
Piazza Plebiscito
1895

Istituto di Clinica Medica della R. Università di Napoli
diretto dal Prof. CARDARELLI

RICERCHE CLINICHE E SPERIMENTALI

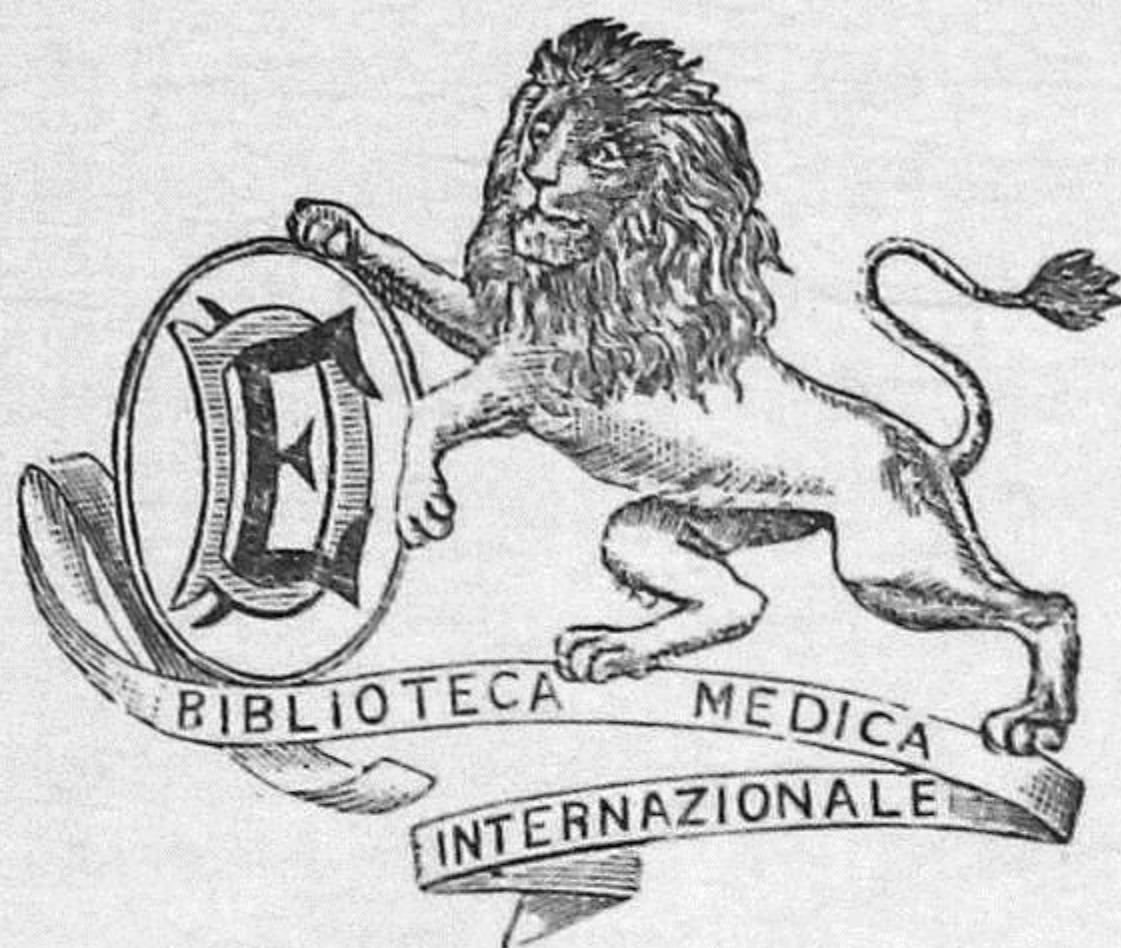
SULLA

TOSSINA ED ANTITOSSINA DIFTERICA

PER I DOTTORI

G. Zagari
Coadiutore, prof. pareggiato
di Patol. e Clin. Prop.

A. Calabrese
Preparatore

Estratto dal *Giornale Intern. delle Scienze Mediche* — Anno XVII.

NAPOLI
LIBRERIA DETKEN & ROCHOLL
Piazza Plebiscito
1895

(I. Comunicazione)

Le nostre conoscenze sulla etiologia e patogenesi della difterite si possono dividere in tre periodi. Nel primo (1883-87) son comprese quelle, che provengono dalle ricerche di Klebs (1) e specie di Loeffler (2), alle quali sono seguite le altre di Babes (3), Paltauf (4), Escherisch (5), e molti altri, i quali, non solo hanno constatato la presenza del bacillo nelle pseudomembrane, ma lo hanno pure coltivato allo stato di purezza, senza però riuscire a produrre, col medesimo, il quadro della malattia, cosa, che ulteriormente (qui comincia il secondo periodo, 1887-90) ottennero Loeffler stesso (6), e meglio ancora Roux e Yersin (7), i quali ultimi non solo coltivarono con facilità,

---

(1) Klebs — *Congresso di Wiesbaden*, 1883.

(2) Loeffler — Untersuchungen über die Bedeutung. *Mitt. a. d. Kais. Ges. Vol. II, p. 421 e seg. 1884.*

(3) Babes — *Zeit. für Hygiene, Vol. V, p. 177.*

(4) Paltauf — *Wiener klin Woch. 1889.*

(5) Escherisch — *Centr. f. Bakt. 1890.*

(6) Loeffler — Weitere Untersuchungen über Diphterie-bacillen - *Centr. für Bakt.*, Vol. II, p. 105, 1887.

(7) Roux e Yersin — Contribution à l'étude de la Diphtérie. *Annales de l'Inst Pasteur*, 1888, pag. 629, 1889, pag. 273 e 1890, pag. 385-

mediante un semplice artifizio di tecnica, il bacillo di KLEBS e LOEFFLER, ma, col medesimo, produssero il quadro generale della malattia, e, coi suoi prodotti, molte delle conseguenze, dovute alla difterite, come le classiche paralisi difteriche, i fenomoni generali di elevazioni di temperatura e di dimagramento; fatti, subito confermati da BRIEGER e FRAENHEL (1), e da SPRONCK (2), che riscontrò inoltre prodursi la nefrite negli animali iniettati con la tossina difterica. Nel terzo periodo (1890-95) sono da comprendere una nuova serie di fatti importanti, dovuti agl'ingegnosi esperimenti di FRAENKEL (1890) (3) BEHRING e KITASATO (1890) (4), BEHRING e NISSEN (1890) (5), BEHRING e WERNIKE (1892) (6), BEHRING, BOER e KOSSEL (1893) (7), di BEHRING e KNORR (1893) (8), di ERLICH, KOSSEL e WASSERMANN (1894) (9), BEHRING ed ERLICH (1894) (10), di BEHRING e BOER (1894) (11), di ARONSON (1894) (1), di ERLICH e KOSSEL (1894) (13), di BRIEGER e GEORG COHN (1892) (14), di ROUX e YERSIN (1889-90) (15), di ROUX e MARTIN (1893) (16: questi instancabili ricercatori hanno acquisito alla scienza una nuova serie di fatti della più alta importanza, pel meccanismo

---

(1) BRIEGER e FRAENKEL — Untersuchungen über Bakteriengifte—*Berlin. klin. Woch.* n. 11, 1890.

(2) SPRONCK — Zur Kenntnis der Pathogenen Bedeutung des Diphteriebacillus — *Centr f. all. pathol. und pathol. Anat.*, n. 7, 1890.

(3) FRAENKEL—Immunisirungversuche bei Diphterie. *Berl. klin. Woch.* N. 49, 1890.

(4) BEHRING e KITASATO - *Deut. med. Woch*, n. 49, p. 113, 1890.

(5) BEHRING e NISSEN — *Zeit. f. Hygiene. Vol. VIII*, p. 412, 1890.

(6) BEHRING e WERNICKE — *Zeit. f. Hygiene. Vol. XII*, 1892, p. 10.

(7) BEHRING, BOER e KOSSEL — *Deutsch. med. Wochenschr.*, n. 17 e 18, 1893.

(8) BEHRING e KNORR — *Zeit. f. Hygiene. Vol. XIII*, 1893.

(91) BEHRING e BOER — *Deut. medicin. Wochenschr.* N. 21, 1894.

(01) BEHRING ed ERLICH — *Deut. medicin. Wochenschr.* N 20, 1894.

(11) ERLICH, KOSSEL e WASSERMANN—*Deutsch. med. Wochenschr.* N. 16, 1894.

(12) ARONSON — *Berlin. klin. Woch.* 1894.

(13) ERLICH e KOSSEL — *Zeitsch. für Hygiene. Vol. XI*, 1894.

(14) BEHRING e GEORG COHN — *Zeitsch. für Hygiene. Vol. XV*, 1894

(15) e (16) *Annales de l'Inst-Pasteur*, 1889, 90, e 94.

col quale nuoce la difterite ed hanno fatto intravedere la speranza, che si possano neutralizzare gli effetti perniciosi, che si svolgono durante la grave malattia.

È risultato dai loro esperimenti: 1° che la difterite è una malattia, la quale si localizza in una data regione, donde prodotti speciali vengono a diffondersi per l' organismo e sono capaci di generare le lesioni anatomiche ed i disturbi funzionali, in una parola, il quadro classico della malattia; 2° che tali prodotti sono segregati dal bacillo stesso e si trovano accumulati sia nei materiali di cultura, nei quali si è lasciato sviluppare, sia nei tessuti degli individui ed animali morti di difterite; 3° che tali prodotti, iniettati in minima quantità, sono capaci, dopo un certo tempo — ciò che è sorprendente, a guisa di periodo di incubazione—di determinare la morte con un quadro clinico ad anatomico, identico a quello che si ottiene qualora s'inietta il bacillo vivente; 4° che in ultimo, con tale tossina, iniettata a grado a grado, ovvero con l' essudato pleurico e con l' urina di animali precedentemente attossicati, si riesce a rendere altri animali immuni contro la difterite, e col siero di sangue, e col latte di questi ultimi ad arrestare il processo difterico di altri, che contraggono la malattia.

Di tutti questi dati, quelli, che più colpiscono ed attirano l'attenzione, sono meritatamente gli ultimi, i quali affermano potersi, con tali prodotti organici di animali immunizzati, impedire il progresso della difterite, ossia guarire questa terribile malattia.

Soprattutto le ricerche di BEHRING (1) e la comunicazione di ROUX al Congresso di Budapest (settembre 1894) hanno attirato l' attenzione di tutto il mondo su questo fatto importante. Il movimento, che ne è seguito, si legge consultando i

---

(1) BEHRING – Gesammelte Abhandlungen für aetiologische Therapie von ansteckenden Krankheiten, *Berlin*, 1893; e Die Blutserumtherapie, *Berlin*, 1893.

diarii medici del giorno, che sono ricchi di resoconti al riguardo.

*
* *

Spinti dai benefizi rilevanti, che verrebbero alla pratica da questi dati scientifici, abbiamo voluto, mossi dal consiglio ed aiuto del nostro direttore, prof. Cardarelli (1), intraprendere delle ricerche che contribuissero a controllare alcuni dei dati dei predetti autori ed a studiare gli effetti, che il siero produce sia nell' organismo sano, che in condizioni patologiche; studio, che potrebbe servire di norma al clinico, che si accinge ad applicare questo rimedio e che poi deve trarne un giudizio adeguato sulla sua efficacia. A noi non spetta di trattare la questione della efficacia del medesimo, convinti come siamo, che, per questo, vi ha bisogno di ben altro materiale che quello, del quale ci è dato disporre.

Per le nostre ricerche, che datano dal mese di settembre del 1894, abbiamo cominciato col saggiare il grado di tossicità di un liquido proveniente da colture di bacillo difterico, in brodo, in grosse fiale, tenute alla temperatura di 37°, per sette ad otto mesi, per esperimenti in corso di altra indole. Questo materiale, filtrato attraverso la candela Chamberland, mostrava un potere tossico per le cavie, determinando edema sottocutaneo ed il quadro delle note alterazioni anatomiche sui visceri addominali (intestino tenue, capsule surrenali, reni, ecc.), ma dopo un periodo di tempo di 5 a 6 giorni a partire dall'inoculazione di 1[2 c. c., per 500 gr. di cavia. La poca tossicità di cui era dotata questa tossina difterica ed il lungo periodo di tempo per la preparazione, ci fecero ben presto abbandonare tale maniera per ottenerla, la quale si avvicina di molto a quella adoperata dagli autori tedeschi.

Frattanto la comunicazione di Roux e Martin, apparsa nel n. 9 (25 settembre 94) degli *Annales de l'Institut Pasteur* richia-

(1) Ci gode l'animo di esprimergli pubblicamente, anche in questa occasione, i sentimenti della nostra più viva gratitudine.

mava sui dettagli, per ottenere, in breve elasso di tempo, un materiale eminentemente tossico dal bacillo difterico, mediante un artifizio di tecnica, il quale, ci era noto, uno dei medesimi autori (Roux), in comunione ad Yersin, aveva già accennato in una delle pubblicazioni precedenti (1).

Fin dai primi giorni di ottobre abbiamo realizzato, *unicamente* sui dati appresi dalla comunicazione dei predetti autori, le condizioni opportune per coltivare il bacillo difterico in matracci a larga base, da noi stessi forniti di appendice laterale, tenuti alla temperatura costante di 37', nei quali un'aspirazione eguale e continua di aria umida, manteneva la ventilazione alle colture, suggerita da Roux e Jersin, come la più opportuna per ottenersi una buona segregazione di tossina.

Innestato in queste bottiglie il bacillo difterico, adoperando brodo peptonizzato al 2 0[0 e leggermente alcalino, dopo 24 a 48 ore che erano tenute a 37°, quando lo sviluppo era ben manifesto, si mettevano in comunicazione con l'apparecchio aspiratore e, già dopo 2 giorni che vi circolava l' aria, si notava l' accrescimento del bacillo divenire notevolmente abbondante. Dopo 5 giorni, la massa del brodo era in modo caratteristico non solo intorbidata sulle pareti ed al fondo, ma anche alla superficie.

In questo stesso periodo, nel matraccio di coltura, vi era già accumulata una notevole quantità di tossina difterica, tanto che, con 0,3, si riusciva, il più delle volte, ad ammazzare 1[2 kgr. di cavia nello spazio di 48 ore.

Inoltre, morfologicamente studiando il bacillo in questo periodo di sviluppo, ci è stato dato osservare che esso acquista una forma più lunga: appaiono, nelle colture, degli aggruppamenti notevoli, come delle larghe placche, ed i bacilli s'impregnano della sostanza colorante in maniera un pò più difficile e non eguabilmente, quasi che vi fossero, nella loro compagine, tratti di differenziamento.

Nei giorni seguenti, l'accrescimento subisce come una sosta: tutti quei granuli, che intorbidano il brodo, vanno successiva-

---

(1) Roux e Yersin — *loco citato*.

mente depositandosi dalle pareti e dalla superficie al fondo; restano solo alcune chiazze sulla superficie del brodo: di modo che, negli ultimi giorni, si ha questo aspetto caratteristico, di avere la massa del brodo chiara, e la superficie, le pareti ed il fondo cariche di patine difteriche.

Parallelamente, in questo periodo di tempo, come osservarono gli autori, che ci hanno preceduto, la reazione del liquido diviene nei primi giorni acida, e, quindi, di nuovo e fortemente alcalina.

Or a noi è stato dato di rilevare il seguente fatto: prelevando innesti da matracci, nei quali era circolata l'aria per tre a cinque giorni, successivamente per alcuni passaggi in serie, di aumentare notevolmente la virulenza del bacillo difterico; di guisa che, mentre nel mese di settembre il bacillo difterico, da noi adoperato, uccideva alla dose di 1 c. c. di coltura di 18 ore, 500 gr. di cavia dopo 76 ore; al mese di febbraio con lo stesso, nelle identiche condizioni, si riusciva ad ottenere, in 48 ore, il medesimo effetto, con 0, 1.

Questo aumento della virulenza del bacillo, indipendentemente dal grado di tossicità del suo veleno, ci pare che meriti di esser tenuto presente, qualora si voglia rinforzare questo germe, che specialmente per azione della luce, e dell'aria, subisce attenuazione, e si potrebbe mettere accanto all'altro metodo, proposto recentemente da Bardach (1), quello, cioè, di prelevare in serie il bacillo dal sottocutaneo di animali (cani), nei quali viene inoculato, non molto virulento, qualche giorno prima.

Da tali ricerche abbiamo appreso altresì che una grande attività, nei matracci di coltura, sia di moltiplicazione dei batteri, sia di segregazione di tossina, si verifica nei primi giorni (fin a 6, 7) in cui circola l'aria; nei seguenti la moltiplicazione del batterio è molto più lenta, e negli ultimi quasi nulla: di pari passo la segregazione della tossina, nei primi giorni è notevolissima e nei seguenti continua sempre, sebbene in grado minore. Infatti, da un lato ripetendo successivamente, come abbiamo detto, innesti di tre a 5 giorni

(1) Bardach — *Annales de l'Inst. Pasteur.* N. 1, 1895.

da matracci con aria, abbiamo, già dopo alcuni passaggi, ottenuto un bacillo difterico virulentissimo; mentre dopo 23 giorni, invece, i bacilli sono come affievoliti nella loro attività, tanto che alcuni degli innesti, presi dopo 23 a 25 giorni, riescono a vuoto; e dall'altro abbiamo potuto vedere che tossine, accumulate in matracci, in cui era circolata l'aria per soli 5 giorni, sono state capaci di produrre la morte di 500 gr. di cavia alla dose di 0,3 in 48 ore; mentre tossine, ricavate da colture di 23-25 giorni, non guadagnano in tossicità che poc'altro, cioè tanto da dare la morte nelle identiche condizioni con 0,1.

Abbiamo potuto inoltre confermare quello, che è ripetuto dagli autori francesi, che, cioè, non tutti i bacilli difterici son capaci di dare luogo alla stessa quantità di tossina. Abbiamo sperimentato su bacilli difterici, provenienti da diverse fonti: 3 specie da noi ricavate da placche, ci fornirono tossine che hanno dimostrato poca efficacia; una sola di queste, coltivata in corrente di aria umida per 23 giorni, non ha fornito che tossine capaci di ammazzare, alla dose di 0.1, c. c., 500 gr. di cavia, in 56 ore; mentre che un bacillo, proveniente da una grave epidemia di difterite, occorsa, or è un anno, a Gallipoli, che fin d'allora per altre ricerche in corso nel laboratorio, avevamo ottenuto dalla gentilezza del collega Sclavo, si è mostrata capace di fornire un buonissimo materiale per le nostre ricerche, segregando eccellenti tossine, che producono la morte di 1[2 kgr. di cavia in meno di 36 ore, alla dose di 0,1; ed è di queste tossine che ci siamo serviti per tutte le ricerche, che riferiamo, ed è appunto questo bacillo che ha acquistato, mediante l'artifizio di coltivazione anzidetta, il grado di virulenza di cui abbiamo parlato.

Dunque, già ai primi di novembre, eravamo in possesso di tossina grandemente velenosa, così come prescrivono gli autori francesi, per procedere alla immunizzazione degli animali. È riconosciuto che, per questa, la scelta si deve far cadere sul cavallo, e le ragioni sono ampiamente svolte dagli autori anzidetti, ecco perchè, senz'altro, abbiamo dato la preferenza a questo animale.

Ad un cavallo del peso di 308 kgr., di anni 17, di aspetto sanissimo—nel quale il prof. Oreste, direttore, della R. Scuola di Veterinaria (al quale dobbiamo la scelta e pubblicamente rendiamo grazie per l' ospitalità accordataci) non ha creduto nemmeno potere ammettere il sospetto d' infezione morvosa, tanto da dichiarare inutile una iniezione di malleina — il 16 novembre 1894, abbiamo praticato la prima iniezione con 0,25 di soluzione di tossina, ottenuta allungandola con soluzione di iodo nella proporzione di 1 su 10.

Per questa immunizzazione del cavallo, abbiamo seguiti i dettagli consigliati da Roux e Martin nella loro comunicazione sugli *Annales de l'Institut Pasteur* (25 settembre), e precisamente secondo il quadro, dai medesimi autori riportato, come il più eccellente, a pag. 615, avendo corrisposto nella maniera migliore, tra i differenti da loro seguiti, sia per la tolleranza dell' animale, sia per la qualità del siero ulteriormente fornito.

I medesimi autori, in questa stessa comunicazione, riportano altri esempi d'immunizzazione di cavalli, ottenuta in tempo più breve (come altresì a noi è nota quella che pratica Klein e qualche altro); ma a tali esemplari non abbiamo creduto di dare la preferenza, edotti dagli ammaestramenti provenienti dall' altrui esperienza, e per nulla corrivi di giungere ad ottenere il siero antitossico in un tempo possibilmente più breve, ma di efficacia non così ben garentita.

Il nostro cavallo, alla prima iniezione della miscela precedentemente detta, per quantità così infinitesimale di tossina, ha dimostrato già un lieve perturbamento nella temperatura, essendosi questa elevata di 0,4. Lievi oscillazioni come queste si sono di tratto in tratto anche osservate nelle iniezioni seguenti, praticate secondo il quadro di Roux anzidetto fino al 3 dicembre; quando si è incominciato ad iniettare la tossina pura; allora inoltre per la prima volta si notò leggiero edema sottocutaneo: edema, che si è osservato pure, dopo il 14 dicembre (5 c. c. di tossina) e qualche altra volta ulteriormente (46' giorno dalla prima iniezione), insieme ad un leggiero grado di elevazione di temperatura (da 0,5 a 1°).

Del resto questi leggieri fatti di reazione non si sono, in-

fine del trattamento, più osservati, e possiam dire di essere stati per questo fortunati d' incontrarci in un cavallo che ha corrisposto in maniera opportuna al trattamento.

Per ciascuna iniezione abbiamo sempre avuto cura di adoperare tossine, delle quali avevamo con precedenza saggiato il potere tossico. Noi abbiamo conservato il materiale ottenuto dal filtro Chamberland allo scuro ed in stufa a freddo (12 a 15°).

Esso non è che un liquido limpidissimo, di un colore giallo carico, di densità da 1005 a 1015, di odore sgradevole, ed evaporandone sulle mani resta l' ingrata sensazione come se si fosse trattato di soluzione di gomma o di una soluzione densa di zucchero.

In alcune delle nostre fiale abbiamo fatto cadere un pezzetto di canfora fusa, la quale, del resto, non ha impedito, alle volte, che impurità si svolgessero nei matracci; ed all'uopo possiamo affermare che, qualora anche un sol batterio, per poco, in tali materiali, inizii il suo sviluppo, devesi subito scartare l'intera fiala. Più d'una volta, infatti, abbiamo voluto rifiltrare e poi saggiare la tossicità di alcune delle bottiglie, che diedero indizi di alterarsi, ed abbiamo avuto a convincerci che basta uno sviluppo anche debolissimo di un batterio banale (subtilis od altro), perchè la tossicità preesistente venisse gradatamente a diminuire ed a sparire. Non è quindi mai abbastanza da raccomandare la più grande precauzione nel filtrare il materiale. La stessa precauzione, va da sè, bisogna tener presente nella preparazione della tossina; che, se durante la coltivazione ad aria corrente, qualche batterio estraneo capita a disturbare la vegetazione del bacillo difterico, il materiale filtrato non godrà di nessuna delle proprietà inerenti alla tossina difterica; e però noi si è soliti, prima di filtrare un materiale di tal genere, di esaminarlo ripetute volte al microscopio e spesso inoltre abbiamo prelevato innesti in varie provette di brodo.

Le iniezioni per la immunizazione del nostro cavallo hanno richiesto lo spazio di 80 giorni, dal 16 novembre al 4 febbraio. È sorprendente rilevare, e risulta da quanto in breve abbiamo precedentemente accennato, la maniera tutta affatto caratteristica con la quale il nostro cavallo ha reagito di

fronte alla tossina difterica. Nel mentre infatti alle prime iniezioni (quantità minime di tossico) si notavano un leggiero perturbamento febbrile, e fatti di reazione locale, manifestantisi con edema e con dolentia, nelle ultime inoculazioni di dosi grandissime di 200 a 300 c. c., questi fatti non si sono che per nulla od in minima parte, osservati. Forse questa tolleranza ottenuta alle grandi dosi, noi dobbiamo alla maniera cauta con la quale siamo proceduti per assuefare il nostro animale a dosi così potenti di tossina, la quale contemporaneamente sperimentata in dosi minime su altri animali (cani, conigli, cavie) era causa degli effetti più perniciosi e spesso ci faceva trepidare nell'adoperarla pel cavallo. Il progressivo aumento del peso del corpo ed il bell'aspetto generale, ci erano garenzie della maniera come noi procedevamo nel trattamento; infatti il peso del corpo, piuttosto che diminuire, come, per iniezioni di tossina difterica, sovente si vede in cani e conigli ecc., nel nostro animale, è andato progressivamente crescendo, fino a raggiungere, il 15 gennaio, 385 Kilg.

Il 4 febbraio, 80' giorno del trattamento, avanti di procedere all'ultima iniezione di 250 c. c. di tossina, abbiamo voluto praticare un piccolo salasso, estraendo 3[4 di litro di sangue: il siero ottenuto è stato da noi saggiato per rilevarne il potere antitossico fin allora guadagnato. Abbiamo, per questo, dato la preferenza alla maniera di procedere di Roux, mescolando 0,1 c. c. di siero con 0,9 di tossina; ed iniettando 1 c. c. della miscela per 500 gr. di cavia, senza ottenere nè meno edema; inoltre abbiamo inoculato a cavie la 50000 parte del loro peso di siero e dopo 12 ore 0,1 di tossina, o di coltura difterica, senza che le medesime avessero presentato alcun disturbo, mentre che le testimoni, inoculate con sola tossina o con solo bacillo difterico, son morte in 36 a 48 ore.

Di questo siero ci siamo serviti per gli esperimenti dei quali è detto in seguito. Frattanto il 16 febbraio abbiamo proceduto ad un abbondante salasso di 2 litri e mezzo di sangue, ed alla iniezione di 300 c. c. di tossina. Del potere antitossico del siero, ottenuto per questo secondo salasso, sono iniziate le prove ed il medesimo servirà per le ulteriori ricerche.

Adunque, dopo un lavoro mai interrotto, per lo spazio di circa 4 mesi ed attraverso difficoltà non indifferenti, unicamente con i mezzi gentilmente messi a nostra disposizione dal Direttore dell'Istituto, siamo riusciti tra i primi in Italia (1) a preparare un materiale molto delicato, non con l'intendimento di metterlo in commercio; ma perchè possa servire precipuamente alle nostre ricerche. Ed oggi non avremmo difficoltà di offrire il nostro siero a chi avesse vaghezza di usarlo per studii speciali.

Questo siero abbiamo conservato in bottiglie di Erlenmayer sterilizzate, a freddo, ed all'oscuro, chiuse ermeticamente, ed a qualcuna abbiamo anche aggiunto 0,5 0[0 di acido fenico; possiamo però dire che il nostro siero, anche senza l'aggiunta di acido fenico, si è conservato finora eccellentemente.

Per le ricerche sperimentali e cliniche, delle quali ora non ci è concesso, per il breve tempo, se non riferirne una parte, ci siamo serviti sia del siero da noi preparato, sia di altro che ci è stato possibile ritirare direttamente da Roux, e dalla nota casa Meister Lucius.

Anzitutto possiamo confermare, che mediante le iniezioni di siero di animali, resi immuni, si può riuscire sicuramente impedire lo sviluppo della grave malattia, negli animali da esperimento (cavie, conigli). Se questo, che è un dato, sperimentalmente abbastanza comprovato, ed al quale portiamo il nostro modesto contributo, lo sia ancora nel campo clinico, nei casi, cioè, di difterite, quali si osservano ordinariamente, non è dato a noi di trattare: e però ci siamo limitati ad analizzare qualche quesito, che pur ha attinenza col trattamento siero-terapico.

Ed infatti un grave problema, che si affaccia in prima linea, alla mente, si è quello che oggi si agita e si giudica in modo diverso dagli autori: riesce, cioè, del tutto innocua l'amministrazione

(1) In Italia, fin oggi, solo il Dr. Brazzola di Bologna ha comunicato (*Rif. med.* n. 29 e *Gazzetta degli Ospedali* n. 19) di esser riuscito a preparare il siero antidifterico dal cavallo.

del siero? Non si ha forse a che fare con materiale ottenuto adoperando sostanze altamente tossiche, le quali sono eziandio capaci di produrre gravi fenomeni generali in un grosso animale, come il cavallo, alla minima dose di 0,1 di c. c.? In altri termini quali sono i veri effetti che si svolgono in seguito alla introduzione del siero negli animali e nell'uomo, non solo allo stato sano, ma anche in condizioni patologiche?

Da molti, oggi, paghi che quest'amministrazione non produce fenomeni ben più gravi della difterite, che si ha a combattere, od altri grossolani e facilmente rilevabili fenomoni, si giudica a prima giunta assolutamente innocuo, da altri invece si grida ai pericoli sia immediati sia tardivi, che ne provengono!

Da lungo tempo si era, è vero, provato che il siero di animali di specie diversa riesce dannoso iniettandolo ad altri animali, per il suo diverso potere isotonico: il sangue, in effetti, può subire, per tali iniezioni, una distruzione notevole dei suoi elementi essenziali e ne possono insorgere fenomeni tossici. Ma in questo caso della siero-terapia, in verità, tali pericoli erano, teoreticamente, assai poco a temere, per la quantità tenue di siero che viene adoperato. Tuttavia l'esperimento ci volea che togliesse il dubbio, e colui, cui toccava di farlo, cioè BEHRING, che primo applicava all'uomo questo metodo curativo, avendo osservato che, iniettando il siero a piccoli bambini, non ne veniva, sulla fede dell'istesso HENOCH, nella cui Clinica erano trattati, alcun danno, eziandio dopo dosi molto grandi, conchiudeva che—*«l'iniezione di siero antidifterico è per l'uomo sfornita di qualsiasi proprietà nociva, egualmente come lo é una soluzione sterilizzata fisiologica di cloruro di sodio»*—(1).

Il rapido diffondersi dell' applicazione del metodo ha quasi reso frustraneo l'insistere su questa prima parte, che esser dovea il ponte di passaggio tra gli esperimenti sugli animali e l'applicazione all'uomo per scopo terapico.

Ma ecco che, nel corso dell' applicazione, non tardarono a sorgere coloro che alzarono forte la voce contro i danni che potrebbero provenirne dall'applicazione della medesima.

---

(1) BEHRING — *Deutsche med. Wochenschrift.* n. 17, 27 aprile 1894.

Primo fra tutti, a Berlino stesso, sorse Hansemann (1), che, frai danni determinati dall'amministrazione del siero, annovera nefrite, alterazione delle crasi sanguigna, e gravi eruzioni cutanee.

Le Gendre (2), in Francia, dopo le iniezioni trovò fosfaturia ed urobilinuria.

Inoltre Baginski (8) fece notare nella sua seconda comunicazione che la maggior parte dei suoi bambini, morti per difterite, ad onta del trattamento, soccombettero con i sintomi di astenia cardiaca, ritmo galoppante, tachicardia, aritmia ecc.

Anche Kossel (4), sebbene in proporzioni minime (6 O[O) ha osservato questi fatti di depressione cardiaca, ma i dettagli al riguardo mancano, e questi fatti di depressione insorgenti in individui, in preda ad infezione difterica, non si sa bene a carico di quale movente causale debbano ascriversi.

Koerte (5) anche ha osservato debolezza cardiaca, sepsi, nefrite, otite media, paralisi, suppurazioni ghiandolari.

Ritter (5) notò che il siero, il quale vendesi in commercio, contiene una grande quantità di fenolo e potrebbe, unicamente per questo, riuscire di pericolo. Ora, vero è, che a Ritter si è risposto esser la quantità di fenolo sempre in dose minore di quella che, alle volte, si usa in pratica, ma pur non bisogna sconvenire che sovente si ha da fare, nelle applicazioni siero-terapiche, con individui in preda a grave malattia e, per giunta, con bambini.

Molti poi sono gli osservatori che hanno richiamata l' attenzione sugli esantemi di varia forma ed importanza, che compaiono o immediatamente dopo la iniezione, nel corso della difterite, od anche in periodo tardivo e dopo la guarigione; esantemi, che, sebbene sono fenomeni di non grave entità, pure possono aggravare lo stato generale per l'irrequietezza che determinano e per l'aumento di pochi decimi della temperatura.

---

(1) Hansemann — *Deutsche med. Wochenschrift*, n. 50, 1894.

(2) Le Gendre — *Societé de médecine de Paris*, 14 dicembre 94.

(3) Baginski — *Berl. klin. Wochenschrift*, n. 52, 1894.

(5) Kossel — *Deutsche med. Wochenschrift*. n. 51, 1894.

(4) Körte — *Berliner klin. Wochenschirft*, n. 46, 1894.

(5) Ritter — *Deutsche méd. Wochenschrift*, n. 50, 1894.

Insieme a questi esantemi sono stati notati fenomeni da parte delle articolazioni. Osservazioni di simil genere si sono riferite da LUBLINSKI (1) da CNYRM (2) da ASCH (3), da MOIZARD e PERREGAUX (4), da WASHBOURN, GOODAL e CARD (5), da COLLA (6), da LINDSAY (7) da SIMON (8) e da molti altri.

Inoltre MENDEL (9) ha anche citato un caso di rinorragia, seguito alle iniezioni.

Ed infine molti, dopo HANSEMANN, hanno descritto dei casi di nefrite per la iniezione del siero. Ma, essendo l' albuminuria molto frequente nella difterite, per vedere la parte che ha il siero nel produrre tale alterazione, si è dovuto ricorrere a gran numero di dati statistici per averne criteri più concludenti. Per KOSSEL (10) l'albuminuria nella difterite si ha nel 50 0[0 dei casi. Per BAGINSKI (11) in quelli curati siero terapicamente essa è stata più frequente. Per LE GENDRE (12) le iniezioni non impediscono la nefrite. Per SEITZ (13) in seguito ad iniezione del siero si ha albuminuria, cilindruria lieve e passeggiera. Per COSTANTINI (14) la nefrite appare più frequentemente della norma negl'iniettati. TREYMANN (15) ha visto nefrite emorragica, VILLA (16) albumosuria, e MUGGIA (17) con

(1) LUBLINSKI — *citato da Cnyrm.*

(2) CNYRM — *Deutsch. med. Wochenschrift*, n. 48, 1894.

(3) ASCH — Zur Casuistik der Heilserum — Esantheme. *Berliner klin. Wochenschrift*, n. 51, 1894.

(4) MOIZARD e PERREGAUX — *Le Bulletin méd.* n. 97, 1894.

(5) WASHBOURN, GOODAL e CARD — *The Britisch med. Journal.* 22 dicembre 94.

(6) COLLA — *Deutsche méd. Wochenschrift*, n. 3, 1895.

(7) LINDSAY — *New-York med. Journal*, gennaio 95.

(8) SIMON — *La médecine moderne*, n 11, 1895.

(9) MENDEL — *Berl. klin. Wochenschrift*, 1894.

(10) KOSSEL — *loco citato.*

(11) BAGINSKI — *loco citato.*

(12) LE GENDRE — *loco citato.*

(13) SEITZ — *Therapeutische Monatscheft*, n. 11, 1894.

(14) COSTANTINI — *Riforma med.* n. 9, 1894.

(15) TREYMANN — *Deutsche med. Wochenschrift*, n. 51, 1894.

(16) VILLA — *R. Accad. med. di Genova*, 3 dicembre 1894.

(17) MUGGIA — *Riferito da Foà alla R. Accad. med. di Torino*, 8 febbraio 95.

due boccette n. 1 e n. 2 di Behring contemporaneamente, nefrite acuta, eritema polimorfo e pleiade ganglionare.

Di fronte a tutti questi incidenti di una entità più o meno rilevante, sui quali hanno richiamata l'attenzione quelli che si sogliono chiamare gli oppositori del nuovo trattamento, vi sono una serie di non meno provati osservatori, i quali hanno riferiti moltissimi casi d'individui trattati col siero antidifterico, senza il menomo disturbo, anzi determinandosi, per effetto del medesimo, il più subitaneo e duraturo benessere.

Per il compito che ci siamo imposti, a noi non tocca di fermarci a considerare come mai la stessa sostanza abbia potuto dare effetti così disparati, poichè tutti gl'incidenti che sono insorti, e sui quali si è richiamata l'attenzione, sono ben dei dati positivi, contro i quali i dati negativi nulla dicono, ed è quindi inutile il non volervi prestar fede.

Ma prima di mettere questi effetti intieramente a carico della sieroterapia noi si è pensato che valesse la pena di istituire una serie di ricerche sperimentali e cliniche, per indagare minutamente gli effetti che conseguono alla introduzione di questa sostanza nell'organismo.

Sia il nostro siero che quello di Roux e di Behring (n.° 1 e n.° 2) sono stati da noi sperimentati prima su conigli e poi sopra individui sani, in casi di nefrite cronica, sia parenchimale sia interstiziale e in un grave caso di anemia; studiando sempre le condizioni generali, il decorso della temperatura, prelevata ogni quattro ore, l'andamento dei prodotti regressivi (mediante analisi accurata delle urine), le condizioni della crasi del sangue, quelle del cuore, del polso, della respirazione.

Esperimenti, così condotti, riguardanti lo studio dell'azione del siero di sangue in generale non sono state, a nostra conoscenza, fin qui compiuti, sopratutto *con le dosi*, che si adoperano per la siero-terapia.

Richet (1), è vero, parla dell'innocuità del siero di sangue di cane, ma iniettandone 1-2 cmc. Kossel (2), raffrontando

(1) Richet — *Semaine médicale*, 1892.

(2) Kossel — *loco citato*.

gli effetti generali di eritema, artralgia, mialgia, orticaria, tumefazioni ghiandolari e febbre, rilevati da LUBLINSKI, SCHOLLTZ, MENDEL, CNYRM e da altri da noi citati, e mettendoli in rapporto con i sieri antidifterici, da tali autori adoperati, provenienti da animali differenti — capra, vacca, montone, cane, cavallo, ecc. — deduce per induzione, poter ammettere che questi effetti siano da attribuire proprio all'attività del siero in genere e che quello del montone più frequentemente provoca orticaria che non quello di capra e di vacca. Nel mentre poi che BEHRING (1), come abbiamo detto precedentemente, dichiara, dal canto suo, che l'introduzione di grande quantità di siero è addirittura indifferente, come una soluzione fisiologica di cloruro di sodio.

***

Abbiamo sottoposto ad esperimento 3 conigli, ciascuno del peso di circa 2 kilogrammi, i quali furono tenuti in osservazione per alcuni giorni, registrando la temperatura, il peso del corpo, lo stato delle urine, ed abbiamo loro iniettato, per due giorni consecutivi, siero di Roux, alla dose di 1 c. c. per ogni chilogrammo di peso, tenendo conto che del medesimo, si adoperano ordinariamente 20 c. c. e che un bambino pesa in media da 20 a 25 chilogrammi.

Giornalmente si è estratta l'urina dai conigli e si è sottoposta a rigoroso esame microscopico e chimico. Breve, quello che ci è stato dato osservare, dopo la iniezione, in questi animali, è solo stato un abbassamento di temperatura da mezzo grado fino ad 1, 7°: non vi è stato nessun cambiamento da parte del peso del corpo e dell'aspetto generale degli animali, che son rimasti egualmente vispi, nè la menoma alterazione da parte delle urine.

Uccisi dopo 3, 5 e 7 giorni dalla 2ª iniezione, non hanno presentato alcuna alterazione macroscopica negli organi parenchimali, fegato, reni, milza, pulmoni: parte di questi or-

---

(1) BEHRING — *loco citato*.

gani, fissati immediatamente e sottoposti a minuto esame istologico, ci hanno convinti della integrità perfetta dei loro elementi istologici.

La nostra attenzione fu soprattutto rivolta all' esame delle sezioni provenienti dai reni, le quali non che presentare indizi di processo infiammatorio, ci hanno offerto degli esemplari bellissimi di rene fisiologico.

Osservazione 1ª.

La mancanza di qualsiasi risentimento da parte dei reni in questi animali, che era il fatto più grave che si attribuiva all'azione del siero, ci ha fatto lecito di sottoporre un primo caso, riguardante un individuo in condizioni fisiologiche — Antonio Marina, ragazzo di anni 11, del peso di 26 chilogrammi—alla iniezione di 6 c. c. di siero Behring, n. 1, il 19 dicembre 1894.

Preleviamo dal diario clinico, così come sono registrati, i seguenti fatti, che ci sembrano degni di esser notati. La temperatura, i polsi e le respirazioni hanno seguito le seguenti modifiche: Prima delle iniezioni, temperatura 37,2°, polsi 100, respirazioni 24; quattro ore dopo, ore 22 (l'iniezione si era praticata alle ore 18 del giorno 19 dicembre) temp. 36,3°, polsi 100, resp. 26; giorno 20 dicembre, ore 2, temp. 37,3°, polsi 120, resp. 26; ore 10, temp. 37,6°, resp. 26, polsi 116; ore 16, temp. 38,4°, polsi 138, resp. 30; ore 20, temp. 39,6°, polsi 108, resp. 24 (il ragazzo è coperto da abbondanti sudori); ore 24, temp. 36,7°, polsi 104, resp. 24.

Durante questa elevazione termica, ha presentato irrequietezza, ansia respiratoria, e localmente solo un leggiero senso di tensione: nessun rossore.

Le *urine*, esaminate dal punto di vista della presenza dell'albumina, con i reattivi più delicati (reazione di Tanret, reazione dell'acido acetico e ferrocianuro di potassio, reazione di Spiegler, reazione di Heller ecc.) non ne hanno fatto rilevare la menoma traccia.

La ricerca del peptone, col metodo di Hoffmeister, è stata pure negativa.

Una buona porzione di urina, lasciata sedimentare, e centrifugata, non ha fatto notare la presenza nè meno di un sol cilindro, nè emasie.

La quantità dell' urina ed i prodotti di riduzione organica (azoto, acido solforico) si son mostrati lievemente aumentati, in rapporto al processo febbrile (1).

Il giorno dopo, 21 dicembre, si è praticata una seconda iniezione, siero Behring n. 2. Questa volta il ragazzo ha mostrato dopo cinque ore un senso notevole d' irrequietezza ed umore tetro, lagnandosi di dolore alla regione d' inoculazione. La temperatura si è elevata di un mezzo grado solamente, dopo 4 ore; quindi è discesa nelle seguenti fin a 6 decimi al di sotto della norma e vi si è mantenuta per 20 ore.

L'*urina*, esaminata per 15 giorni, non ha presentato da parte dell'albumina o dei cilindri o del sangue la menoma traccia.

È degno di considerazione il reperto del sangue, esaminato ripetute volte dal punto di vista dell'emoglobina e del numero dei corpuscoli rossi. Dopo l'iniezione questi elementi sono diminuiti fino a scendere a 55° l'emoglobina (emometro di Fleischl) ed a 4,040,000 i corpuscoli rossi, per risalire nei giorni consecutivi a 70° la prima, a 5,125,000 i secondi (media di 3 osservazioni).

Osservazione 2.ª

Una bambina di anni 6, Cerra Assunta, del peso di 17 kilogr., in condizioni fisiologiche, fu tenuta in osservazione per tre giorni, come il caso precedente; riceve 6 c.c. di siero Behring n. 1: fa notare solamente una depressione di un grado di temperatura per 24 ore, la quale veniva misurata sempre

(1) Sono in corso ricerche sull'influenza del siero antidifterico del cavallo, comparativamente a quella del siero dello stesso animale non immunizzato sopra il ricambio organico, rilevando con metodi precisi, il bilancio organico, prima e dopo l'amministrazione di quelle sostanze.

esattissimamente ogni 4 ore; e lieve diminuzione dei corpuscoli rossi del sangue.

Localmente tanto in questa, quanto in tutti gli altri casi, circostanza che per brevità tralasceremo in seguito di ripetere, non abbiamo osservato che un leggiero edema, senza il menomo rossore, e leggiera dolentìa che si è dileguata in qualche giorno.

Il reperto sulle urine ha confermato quanto abbiamo trovato nella osservazione precedente, intorno all'assenza di modificazioni sull' uropoiesi.

Osservazione 3.ª

Pasquale Leone di anni 36, pesa 54 kilogr.; riceve 25 cmc. del nostro siero. Di quello che si è rilevato, merita di esser riferita una leggiera elevazione di temperatura ed una modificazione nella curva sfigmica del polso, in quantochè l'ascissa che costituisce la branca ascendente è divenuta più alta e la discendente più dispiegata.

Questo rinforzo del polso si è mantenuto per circa 24 ore, anche quando la temperatura era ritornata al normale.

Le urine non hanno fatto rilevare, anche in questo caso, alcunchè di patologico.

Osservazione 4.ª

Una donna, Ersilia Filidei, di anni 55, del peso di 56 chilogrammi, in grave stato di anemia, per abbondanti perdite di sangue, ha ricevuto 20 c. c. del nostro siero.

In questa si son ripetuti gl'identici fatti che nel caso precedente, sia da parte della temperatura, la quale da 36,6° prima della iniezione, è salita, 8 ore dopo, a 38,1°; sia da parte del polso, che è divenuto molto più forte e pieno, e la branca ascendente della curva sfigmica raggiunse in altezza il doppio di quanto soleva prima.

Le urine sono rimaste libere di elementi anormali.

Dopo sette giorni l'inferma andò soggetta a leggiera orti-

caria, limitata alla metà sinistra dell'addome, (lato dell'iniezione).

Il modo come hanno reagito questi diversi individui, studiati con una certa attenzione, sorvegliando le principali loro funzioni, ci spinge ad alcune considerazioni, le quali ci riserbiamo di fare in ultimo. Ma altresì ci ha rilevato la perfetta indifferenza che il siero ha sul rene di individui sani. Siccome però il siero s'impiega in casi d'individui debilitati ed in preda ad attossicamento, quale appunto quello dato dalla grave infezione difterica, ed in questo caso il rene è appunto quello che è il più delle volte affetto da processo infiammatorio, così ci è sembrato che valesse la pena di studiare diligentemente le modifiche che subisce la funzione renale per azione del siero, quando la medesima si trova già alterata; in quanto che, se nè pure in questo caso si avvera risentimento da parte del rene, allora, del certo, si avrà la prova decisiva che nefrite, da parte e per la semplice azione del siero antidifterico, non se ne produce.

L'importanza di spingere fino a questo punto le indagini, nello intento di contribuire alla soluzione del problema, si è affacciata anche alla mente di Ritter (1), il quale ha sperimentalmente provocato nei conigli un'albuminuria artificiale, e dopo che questa scompariva ha iniettato siero di sangue, in quantità corrispondente al peso del corpo ed ha visto riapparire l'albuminuria.

Ma la distanza che passa fra l'albuminuria artificiale del coniglio e le condizioni di un rene ammalato per nefrite, sia difterica, sia di altra natura, è tale che giustamente fa giudicare al Ritter stesso i suoi esperimenti « *non del tutto dimostrativi.* »

Osservazione 5.ª

Giuseppe di Maio, di anni 18, del peso di 71 chilgr. affetto da

(1) Ritter — *Berlin. klin. Woch.* n. 46, 1894.

nefrite parenchimatosa cronica,datante da nove mesi, è tenuto in osservazione per 10 giorni.

L' urina delle ventiquattr'ore oscillava tra 800 e 1300 c.c., di densità 1013 a 1020, con urea 15 a 19 grammi per litro, con albumina da 10 a 20 gr. 0[00, con cilindri granulosi, taluni lievemente infiltrati di grasso: niente sangue, nè cilindri epiteliali, nè emasici.

Gli s'iniettano 10 c.c. di siero Behring n. 2. La quantità dell'urina, la sua densità, il percentuale di urea, ed il quantitativo di albumina sono oscillati, nei giorni consecutivi, fra i medesimi limiti che nei giorni precedenti alla iniezione e l'assenza di sangue nelle urine e di cilindri emasici, e dei soliti altri sintomi generali, che accompagnano il riacutizzarsi della nefrite, ci hanno concordemente potuto far conchiudere che il processo nefritico per nulla avea risentito dell' introduzione nell'organismo del siero antitossico.

Osservazione 6.ª

Di Silvestro Eugenio, di anni 17, peso del corpo Kilg. 51,700 affetto da nefrite parenchimale cronica (notata fin dai primi di dicembre ultimo), con pleurite essudativa a sinistra.

È stato in osservazione per più di un mese: in questo tempo le urine, che d'ordinario emetteva, erano da 500 ad 800 c. c., con peso specifico 1018-1023, con 8 ad 11 gr. di albumina per litro, e facevano notare al microscopio cilindri ialini e granulosi. Si pratica un'iniezione di 25 c. c. del nostro siero, e nei giorni seguenti l' infermo, tenuto d' occhio come il caso precedente, non ha fatto osservare il menomo sintoma, sia da parte delle urine, sia da parte del generale, che accennasse a riacutizzazione del processo renale. Soltanto, dopo 6 giorni, presentò leggiera orticaria.

Osservazione 7ª

Giuseppe Coletti, di anni 61, peso del corpo 59 chilogr., affetto da nefrite interstiziale cronica da più di un anno. Ha

discreta raccolta di transudato nelle due pleure, da raggiungere a destra la 7ª costola, a sinistra la 8ª. Non presenta vizi valvolari: vi ha solo ipertrofia del ventricolo sinistro, edemi, leggiera cianosi.

Le urine presentavano, nei giorni che precedettero l' iniezione del siero, i seguenti caratteri: quantità 1300 a 1700 c. c., con densità 1006 a 1013, albumina gr. 0.20 a gr. 0.50 0[0, cilindri ialini, niente emasie.

Fatta l' iniezione di 10 c. c. di siero Behring n.2 alle ore 14, dopo due ore, la temperatura, che era stata normale, cominciò ad abbassarsi, e dopo 6 ore, raggiungeva 35,2: il polso si fece frequente, la cianosi divenne pronunziatissima. L' ammalato passò la notte molto male, il polso e la respirazione erano notevolmente aumentati in frequenza, la temperatura, al mattino seguente, raggiungeva appena 35.6, la cianosi era ancora intensa, ed il polso frequentissimo ed aritmico, il cuore debole: si notava ansia respiratoria. L'ammalato si sente male e si deve intervenire con tonici, ed eccitanti, si amministrano poche gocce di strofanto, si dà del marsala (ore 8 a.) lo si riscalda con bottiglie calde sotto ai piedi, gli si fa una iniezione di caffeina. La temperatura si è durante il giorno progressivamente rialzata fin a raggiungere il normale, come si sono migliorate le condizioni della funzione cardiaca, tanto da diminuire notevolmente l'ansia respiratoria e la cianosi.

Le urine, durante quello stato di ipotermia e di stanchezza cardiaca (poichè è evidente che quelle condizioni del polso e del cuore non possono interpretarsi in maniera differente) sono per tali condizioni circolatorie notevolmente diminuite di volume, da scendere fin a 300 a 400 c. c., con densità 1014; ma la loro composizione non ha presentata alcuna modifica da quella che avea prima dell'iniezione: albumina gr. 1[2 0[00, assenza completa di sangue e di cilindri emasici, e quindi, oltre che per l' assenza di febbre e di disturbi da parte dello stomaco, anche per i caratteri delle urine non è a pensare a riacutizzamento della nefrite o ad attacco uremico.

Sono molto interessanti i dati forniti dall'esame del sangue in questo caso: prima delle iniezioni i corpuscoli rossi si con-

tavano al numero di 5,050,000, e l'emoglobina segnava 80 all'emometro di Fleischl: nei giorni consecutivi all'iniezione, il numero dei corpuscoli rossi è sceso in media a 3,500,000, e l'emoglobina a 55.

Osservazione 8.ª

Quantunque ci fossero noti gli esperimenti già citati di Richet e di altri sull'innocuità del siero di animali sani, iniettato all'uomo, in una quantità piuttosto piccola, per scindere possibilmente tra gli effetti osservati per il siero antidifterico, quelli inerenti al potere distruttore del siero di sangne in genere, dall'effetto della sostanza immunizzante contenuta nel siero stesso, abbiamo iniettato ad un individuo—Saviello Raffaele, di anni 16, del peso di 66 chilogrammi, in condizioni fisiologiche—30 c. c. di siero di sangue di cane. In questo caso non abbiamo avuto modifiche nè da parte del sangue per quanto riguarda il contenuto di emoglobina ed il numero dei globuli, nè da parte dell'attività cardiaca; nè alcuna modificazione nell' urina, invece questo caso ci ha offerto un esempio classico di orticaria, manifestatasi al 7° giorno dopo l'iniezione, occupante tutta la superficie del corpo, e che svanì dopo 3 giorni (1).

L'insieme delle nostre osservazioni cliniche e sperimentali, che brevemente abbiamo esposto, si possono aggruppare in alcune unicamente istituite per vedere se il siero antitossico è veramente una sostanza nociva per l'epitelio renale e comprendono i tre esperimenti sui conigli, i sette sugl'individui trattati, di cui quattro in condizione di rene fisiologico e tre di rene con forme diverse d'infiammazione; in altre, per indagare quali modificazioni si determinano in peculiari tessuti,

(1) Anzichè esporre queste osservazioni secondo la data, ci è sembrato qui opportuno aggrupparle secondo alcuni dei sintomi rilevati: va da se— risulta dall'epoca di preparazione del nostro siero — che le osservazioni III, IV e VI sono state le ultime.

come il sangue, ed in peculiari funzioni, come la termogenesi, la circolazione ecc.; in ultimo abbiamo voluto vedere se qualcosa di simile si verificasse mediante il siero di sangue di animale sano.

Se si dà uno sguardo ai diversi sintomi che ci è stato dato di rilevare, anzitutto si scorge: che l'iniezione di qualunque siero e tanto meno di quello antidifterico, a differenza di quanto pensano Behring, Henoch, Huebner e Kossel, in una certa quantità, non riesce all'organismo assolutamente indifferente come « *eine sterilisirte physiologische kochsalzlösung* ».

A noi pare, volendo collegare quanto si é esposto nelle diverse osservazioni che il siero antidifterico ha una chiara influenza sul decorso della temperatura, determinando il più delle volte, un elevamento di mezzo ad un grado (osservazione I, 1ª iniezione, osservazione III, osservazione IV): solo in un numero minore di quelli da noi trattati, si è avuto un leggiero abbassamento (osservazione II, osservazione VII). Or siccome in nessun caso di quelli trattati col siero, da noi preparato, senz' aggiunta di acido fenico, si è verificato abbassamento di temperatura, ci par lecito supporre, che forse potrebbe a questo contribuire, in certo modo, la presenza nel siero Behring dell'acido fenico, l'azione deprimente del quale è a tutti nota. A quest' interpetrazione si oppone quello che ci è occorso per la 1ª iniezione nella osservazione I, il che non sappiamo spiegarci se non ricordando a noi stessi come questi sieri siano tuttavia dei composti organici, la cui costituzione chimica ha molti componenti spesso variabili ed ancora poco noti.

Abbiamo potuto rilevare inoltre che, parallelamente alle oscillazioni della temperatura, si hanno delle modifiche ne'caratteri sfigmici del polso, il quale diviene più forte e più pieno, specie quando abbiamo adoperato il siero senz'aggiunta di acido fenico.

Un altro dato importante che risulta dalle nostre osservazioni riguarda le modifiche della costituzione della crasi sangnigna. Vi sono i dati, ci sembra, nelle nostre osservazioni, per poter ammettere un'azione nel siero antidifterico spiegan-

tesi sui globuli rossi e sull'emoglobina, in maniera da diminuirne sensibilmente il quantitativo.

È questa una proprietà inerente al siero del sangue, come si potrebbe pensare, o qui è accresciuta dalla sostanza tossica, che l'accompagna, essendo piccola la quantità del siero che si inietta? Spetta ad ulteriori ricerche risolvere questo quesito.

I fenomeni di orticaria possiam dire, invece, che piuttosto che mettersi in rapporto col siero antitossico, si debbono addebitare al siero di sangue in genere: l'osservazione VIII di individuo inoculato con siero di sangue di cane normale ne ha fornito un classico esemplare.

Quello poi che possiamo affermare nella maniera più recisa è che sia il siero antidifterico, sia il siero di animale sano, nelle proporzioni fin dove noi ci siamo spinti, non esercita la menoma influenza sul rene sano ed eziandio sul rene affetto da processo infiammatorio cronico; per nulla infatti il medesimo ha accennato a risentirsi dietro l' uso del siero, mentre sappiamo come, nel corso di queste gravi malattie, le minime sostanze deleterie per il rene, riescono a riacutizzarne il processo.

In ultimo da queste nostre osservazioni risulta il potere che in casi speciali ha il siero antidifterico, di deprimere l' attività cardiaca. Al riguardo la 7ª osservazione ci fornisce l' opportunità di fare qualche considerazione.

È vero che questi sintomi di depressione cardiaca, i quali nel caso in parola sono stati di una certa entità, sono il più delle volte passeggieri, ma devono esser tenuti presenti per sorvegliare l'ammalato che viene curato col siero.

Trattandosi in quel caso di nefrite interstiziale cronica, molti sono gli ammaestramenti che se ne ritraggono.

Nell'unità di tempo, per la deficiente eliminazione da parte dei reni, hanno dovuto soffermarsi nell' organismo maggiori quantità dei prodotti iniettati di quello che non avviene negli altri casi. Ed i rapidi fatti di squilibrio del compenso cardiaco: intensa cianosi, affanno, polso piccolo e frequentissimo, aritmia, ipotermia, e la notevole diminuzione dei componenti del

sangue, sono tutti sintomi che avvalorano il concetto che ci siamo formati, che in questi casi peculiari, cioè, il siero può produrre serii guasti nel sangue ed influire sull'energia cardiaca e sulla termogenesi.

*
* *

Durante queste ricerche, sulla difterite, ci era sorto potente il desiderio di sapere se le sostanze, dotate di virtù antitossica, che s'iniettano nell'uomo e negli animali, vengono ad essere neutralizzate intieramente nell'organismo che le riceve, ovvero si eliminano tali quali sono state introdotte. Nessuno crederà oziosa questa ricerca, quando si considera che sostanze antitossiche da animali immunizzati — pecore, vacche ecc. — si trovano anche nel latte (Erlich), e che la tossina, iniettata sotto la pelle, si ritrova appunto nelle urine.

Raccolta l'urina di individui sani (osservazione 1ª e 2ª), incominciando dalle ore seguenti alla iniezione, e passatala per filtro Chamberland, l'abbiamo iniettata a cavie, da 3 a 15 c. c. e dopo dodici ore le medesime furono inoculate con coltura virulenta di difterite, insieme ad altre di controllo.

Dieci esperimenti così istituiti ci hanno dato la menoma differenza in quanto alla sopravvivenza rispetto agli altri animali adoperati come controllo.

Or se si considera che nell'individuo si son fatti pervenire 6000 unità antitossiche e che per immunizzare una cavia sono sufficienti quantità veramente piccole di antitossina, è legittimo pensare che queste anche potessero esser contenute in 15 a 20 c. c., qualora si eliminassero.

Tali ricerche non crediamo ancora esaurite: altre sono in corso tendenti a risolvere questo quesito.

*
* *

Un altro problema, che a noi è sembrato della più alta importanza e che ci siam dati a studiare sperimentalmente, si è quello di ricercare in quale parte dell'organismo di un ani-

male, che vien sottoposto alle iniezioni di tossina difterica, si svolgono di preferenza quelle sostanze, che dimostrano virtù antitossica. Si svolgono esse, dietro lo stimolo della tossina, in particolari organi e tessuti, e son poi raccolte dal sangue circolante, ovvero, si formano nel sangue stesso?

Da quanto è risultato dagli studi recenti, ai quali abbiamo accennato, è risaputo, che per l'iniezione del veleno difterico tutti i tessuti presentano notevoli alterazioni; come altresì che gli animali, i quali ricevono quantità minime di tossina, possono sfuggire alla malattia e guadagnare l'immunità. Il che dà motivo a supporre da un lato che tossina si trovi nei diversi tessuti, e che, dall'altro, nei casi, i quali superano l' attossicamento, l'antitossina svoltasi, è stata in copia tale da neutralizzare gli effetti della tossina introdotta.

Partendo da queste considerazioni, e dai noti esperimenti di Behring e Kitasato (1), i quali hanno dimostrato proprietà immunizzanti nel liquido pleurico e nell'urina di animali uccisi col bacillo difterico, abbiam voluto, prelevando parti diverse di animali, iniettati con tossina, ed ottenendone degli estratti allo stato di purezza per mezzo del filtro Kitasato, vedere quale di esse dimostrasse un potere immunizzante più pronunziato. *Caeteris paribus* a noi sembra, per ora, poter dire che la massa edematosa di tessuto sottocutaneo sia quella, che, di preferenza, si mostra più ricca di principii protettivi.

Ulteriori ricerche, in corso, ci auguriamo chiariscano questo intrigato problema.

Napoli, 19 febbraio 1895.

(1) Behring e Kitasato — *Deut. méd.* *Wochenschrift*, n. 50, 1890.